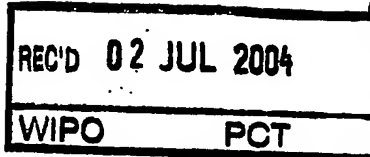


PT 04 / 00015



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

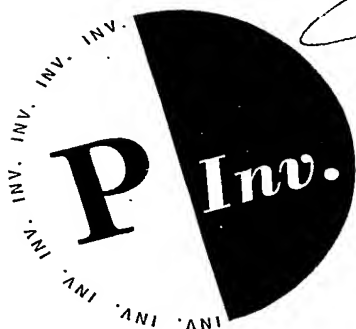
**CERTIFICADO DE PEDIDO
DE PATENTE DE INVENÇÃO**

Certifica-se que os documentos em anexo estão conforme o original do pedido de patente de invenção n.º 102979.

O pedido foi apresentado no INPI no dia 26 de Junho de 2003.

Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 29 de Junho de 2004

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



*Pelo Presidente do Conselho de Administração
do Instituto Nacional da Propriedade Industrial*



**INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

Campo das Cebolas - 1149-035 LISBOA - Portugal
Telef.: +351 21 881 81 00 - Linha Azul: 808 20 08 89
Fax: +351 21 886 00 68 - +351 21 887 53 08
E-mail: Inpi@mail.telepac.pt

Campo das Cebolas – 1149-035 LISBOA
Telefs: 21 888 51 51 / 2 / 3
Linha Azul: 21 888 10 78 Fax: 21 887 53 08 / 21 886 00 66
E-mail: inpi @ mail.telepac.pt



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

PAT / MOD 4

FOLHA DO RESUMO

<input checked="" type="checkbox"/> PAT. INV. <input type="checkbox"/> MOD. UTI. <input type="checkbox"/> MOD. IND. <input type="checkbox"/> DES. IND. <input type="checkbox"/> TOP. SEMIC.			CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
Nº de Objectos _____ N° de Desenhos _____			
Nº <u>102979</u> (11) DATA DO PEDIDO <u>26 / 6 / 03</u> (22)			
REQUERENTE (71) (NOME E MORADA) Castania Sociedade Agroflorestal, S.A. Quinta de Vila Boa de Arufe Rebordainhos Apartado 206 CODIGO POSTAL <u>5301-903</u> <u>Bragança</u>			
INVENTOR (ES) / AUTOR (ES) (72) Susana Maria Traquete Serrazina Aladje Baldé Sandra Cristina Fonseca Maria Salomé Pais			
REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE (S) (30)			FIGURA (para interpretação do resumo)
DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	Nº DO PEDIDO	
EPÍGRAFE (54) Genes codificantes de Óxido de Aleno Ciclase (AOC), Cistatina, β -1,3-Glucanase e de Proteína Taumatin-like isolados de Castanheiro Europeu (Castanea sativa Mill.)			
RESUMO (max 150 palavras) (57) Os genes codificantes para as enzimas Óxido de Aleno Ciclase (AOC), Cistatina, β -1,3-Glucanase e de Proteína Thaumatin-like (AOCCs, CystCs, β GlucCs e tl1) foram isolados de Castanheiro Europeu. Estas enzimas são expressas ao longo da infecção pelo fungo patogénico Phytophthora cinnamomi Rands., e são responsáveis pela defesa e combate da planta contra a doença da tinta. Os genes isolados regulam a expressão das enzimas referidas e quando sobreexpressos conferem à planta maior tolerância contra a doença da tinta. Os referidos genes podem ser inseridos em sense em Castanheiros, Sobreiros e outras espécies lenhosas, permitindo uma maior tolerância à doença provocada por P. cinnamomi. Consequentemente as plantas de variedades com elevado interesse económico podem ser protegidas e preservadas, sem perda da qualidade dos frutos e da madeira.			



DESCRIÇÃO

Genes codificantes de Óxido de Aleno Ciclase (AOC), Cistatina, β -1,3-Glucanase e, de Proteína *Taumatín-like* isolados de Castanheiro Europeu (*Castanea sativa* Mill.)

OBJECTO DA INVENÇÃO


A presente invenção diz respeito ao isolamento e identificação de sequências de nucleótidos codificantes para proteínas envolvidas na resistência ao fungo patogénico *Phytophthora cinnamomi*, causador da doença da tinta em Castanheiro, e a métodos para o melhoramento da resistência recorrendo a plantas transformadas com uma construção contendo um ou mais genes isolados e às plantas e sementes transformadas com essas construções.

ESTADO DA TÉCNICA

O Castanheiro Europeu (*Castanea sativa* Mill.) é uma espécie lenhosa com grande importância económica pela variedade de produtos que fornece, derivados da madeira e do fruto. Do ponto de vista ecológico a cultura do castanheiro oferece igualmente a vantagem de cobertura e fixação do solo, especialmente em zonas montanhosas e muito declivosas.

Na última década assistiu-se a um acentuado declínio na área de distribuição desta espécie devido a vários factores: por um lado, o envelhecimento das populações e, por outro, a certas doenças, nomeadamente a doença da tinta, provocada pelos fungos *Phytophthora cinnamomi* e *Phytophthora cambivora* e, mais recentemente, a doença do cancro, provocada pelo fungo *Criphonectria parasitica*.

Em Portugal a espécie *C. sativa* sofreu um decréscimo acentuado a partir de 1886 [Malato-Beliz (1987), O castanheiro na economia e na paisagem, Edição da Câmara Municipal de Castelo de Vide], em resultado da doença da tinta. Os programas de selecção de clones tolerantes iniciaram-se nos anos 40 por Vieira Natividade e foram prosseguidos nos anos 60 por Carvalho Fernandes [Fernandes, C.T. (1966), A “doença da tinta” dos castanheiros. Parasitas do Género *Phytophthora* de Bary, Dissertação de Concurso para Investigador em Patologia Vegetal, Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Centro de Investigações Florestais, Alcobaça]. A maior parte dos clones seleccionados com base na resistência à doença perderam-se nos últimos 50 anos, restando actualmente muito pouca informação no que respeita à identidade genética dos que sobreviveram.



A doença da tinta em árvores adultas de *C. sativa* manifesta-se, segundo Telhada J.A.B.M. (1990, A “tinta” do castanheiro – aspectos principais e perspectivas de luta. *Vida Rural*, 5, 36-39), por um enegrecimento das radículas e raízes mais finas e a consistência mole da respectiva epiderme. Aqueles tecidos entram em decomposição, provocando a morte progressiva dos ramos. Nas raízes mais grossas e/ou no colo das plantas, são observadas manchas escuras, quase negras [Grente, J. (1961), La maladie de L’Encre du Chataignier I – Étiologie et Biologie. *Ann. Epiphyties*, 12, 5-24].

Na parte aérea, os dois autores anteriormente referidos descrevem o amarelecimento das folhas, de cima para baixo, iniciando-se nas extremidades dos ramos. O limbo pode apresentar-se ligeiramente fechado em V. As folhas amarelecidas não apresentam queda outonal.

As estruturas infecciosas em *P. cinnamomi* correspondem a zoósporos que podem existir perto da raiz, principalmente em condições de alagamento. A penetração do fungo no tecido vegetal pode dar-se por via intercelular, na qual um tubo germinativo avança entre as paredes anticlinais de duas células epidérmicas, ou por via intracelular, também por intermédio de tubo germinativo [Dale, M.L., Irwin, J.A.G. (1991), Stomata as an infection court for *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis* in chickpea and a histological study of infection, *Phytopathology*, 81, 375-379]. Nas raízes mais finas e caules não lenhificados a penetração do fungo ocorre através da epiderme [Whiteside, J.O. (1971), Some factors affecting the occurrence and development of root rot on citrus trees, *Phytopathology*, 61, 1233-1238]. Em tecidos lenhosos, suberificados ou na coifa, a penetração do tubo germinativo é possível apenas se existir ferimento [Boccas, B., Laville, E. (1978), Les maladies à *Phytophthora* des agrumes, SETCO-IRFA Ed., Paris].

Dos estudos de caracterização molecular por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) de clones tolerantes à doença da tinta [Seabra, R.C., Ribeiro, G., Cotrim, H., Pais, S. (1996), First Approach for the Molecular Characterisation of Chestnut Clones, *Silva Lusitana*, 4(2), 251-253; Seabra, R.M.L.C. (1998), Transformação Genética de *Castanea sativa* Mill. e Caracterização Molecular do Género *Castanea*, Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa], conclui-se que as populações naturais que resistem às doenças possuem uma boa base de diversidade genética. Estes resultados constituem a base

científica para o prosseguimento dos estudos no sentido de isolar e caracterizar os genes de resistência à doença da tinta, o que constitui o objectivo do presente trabalho.

Nos últimos anos tem sido desenvolvida investigação no sentido de identificar os genes responsáveis pela resistência a diferentes doenças (genes R), tendo-se verificado que existe uma grande homologia entre eles. A existência de genes R identificados e clonados abre a possibilidade de os transferir, por transformação genética, para genótipos seleccionados.

Os genes que codificam as enzimas AOC, Cistatina, β -1,3-Glucanase e *Taumatococcus* estão descritos como importantes na defesa de variadas plantas ao ataque por microorganismos patogénicos.

O passo catalizado na via biossintética do jasmonato pela AOC é importante na resposta à ferida em tabaco, batata e *Arabidopsis*. Na última década, os jasmonatos foram reconhecidos como elementos centrais numa cascata de sinal baseada em lípidos, a qual tem um papel chave nas reacções de defesa de plantas contra o ataque por patógenos. Um trabalho importante para o estudo da AOC em tabaco foi descrito por Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Pitzschke, A., Miersch, O., Ziegler, J., Ryan, C.A. e Wasternack, C. (2003), Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato – amplification in wound signalling, *The Plant Journal*, 33, 577-589.

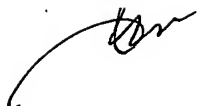
As Cistatinas nas plantas encontram-se envolvidas na regulação do *turnover* proteico e têm um papel importante na resistência contra insectos e patógenos. Também denominadas de inibidores de proteases de cisteínas, inibem a acção de proteases libertadas pelo patógeno aquando da infecção da planta, as quais causam grave dano às células do hospedeiro. Nas folhas de *Arabidopsis* as Cistatinas são fortemente induzidas pela ferida, pelo ataque de patógenos não virulentos e pelo óxido nítrico [Belenghi, B., Perazzolli, M., Delledonne, M. (2002), ATCYS from *Arabidopsis thaliana* encodes a cysteine-protease inhibitor that functions as a negative regulator of hypersensitive cell death, *Proceedings of the XLVI Italian Society of Agricultural Genetics - SIGA Annual Congress*, Giardini Naxos, Italy, 18/21 September, Poster Abstract 5.13]. Mais pormenores sobre a acção destas enzimas podem ser consultadas em Kondo, H., Abe, K., Nishimura, I., Watanabe, H., Emori, Y. e Arai, S. (1990), Two Distinct Cystatin Species in Rice Seeds with Different Specificities against Cysteine Proteinases, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 265, No. 26, 15832-15837.

As β -1,3-Glucanases de plantas são proteínas abundantes envolvidas em diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento, incluindo microsporogénese, germinação de pólen, fertilização, germinação de sementes e defesa contra patógenos. As β -1,3-Glucanases de plantas estão divididas em pelo menos três classes, dependendo da sua estrutura primária. A Classe III contém as glucanases induzidas por patógenos. A expressão de muitas β -1,3-Glucanases pode ser induzida por elicitadores fúngicos, ferida, ácido salicílico, etileno e outros indutores químicos. Os genes das β -1,3-Glucanases também podem ser expressos durante a resposta hipersensitiva em folhas de tabaco inoculadas com o vírus TMV. Pensa-se que as β -1,3-Glucanases actuam directamente contra os fungos, digerindo os β -1,3-glucanos da sua parede, ou indirectamente, digerindo os polisacáridos do patógeno e do hospedeiro para produzir elicitadores capazes de despoletar uma resposta hipersensitiva. As β -1,3-Glucanases em geral têm sido alvo de muitos estudos, entre os quais o de Cheong, Y.H., Kim, C. Y., Chun, H.J., Moon, B.C., Park, H.C., Kim, J.K., Lee, S.-H., Han, C.-D., Lee, S.Y., Cho, M.J. (2000), Molecular cloning of a soybean class III β -1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection, *Plant Science*, 154, 71-81.

A acção de várias isoformas de *Taumatina-like* está provavelmente envolvida na permeabilização da membrana celular da célula patogénica alvo, após a ligação específica de várias unidades de proteínas *Taumatina-like* não solúveis em água a β -1,3-glucanos. Entre outras referências, as proteínas *Taumatina-like* encontram-se descritas em: Trudel, J., Grenier, J., Potvin, C., Asselin, A. (1998), Several Taumatina-Like Proteins Bind to β -1,3-glucans, *Plant Physiology*, 118, 1431-1438; Darby, R.M., Firek, S., Mur, L.A.J., Draper, J. (2000), A thaumatina-like gene from *Asparagus officinalis* (AoPRT-L) exhibits slow activation following tissue maceration or salicylic acid treatment, suggesting convergent defence-related signalling in monocots, *Molecular Plant Pathology*, 1(6), 357-366.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os genes codificantes para as enzimas AOC, Cistatina, β -1,3-Glucanase e *Taumatina-like* foram isolados de plantas de *C. sativa* tolerantes à doença da tinta, após inoculação com o fungo patogénico *P. cinnamomi*. Estas enzimas são expressas após e ao longo do tempo da infecção e, entre outras, são responsáveis por diferentes respostas de defesa da planta. Os genes isolados regulam a expressão das enzimas referidas e quando silenciados produzem plantas com alto grau de susceptibilidade à doença.



Os referidos genes podem ser inseridos em *sense* em castanheiros e em outras espécies da família das Fagáceas (por exemplo nos géneros *Fagus* e *Quercus*). Consequentemente, as variedades de Castanheiro Europeu economicamente importantes podem adquirir uma maior tolerância à doença da tinta provocada pelo fungo *P. cinnamomi*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO E DAS SUAS APLICAÇÕES

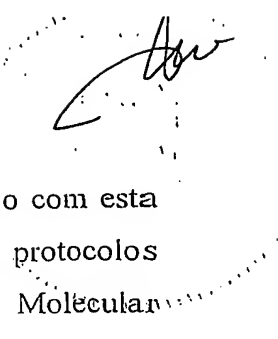
A presente invenção fornece novos genes isolados de Castanheiro Europeu, produzidos durante o processo de infecção com *P. cinnamomi*. Estes genes codificam para uma enzima de sinalização do mecanismo de defesa – AOC –, para uma enzima protectora da proteólise – Cistatina –, para uma hidrolase da parede celular do fungo – β -1,3-glucanase – e para uma enzima permeabilizadora da membrana celular do fungo – *Taumatina-like*.

As sequências de ácidos nucleicos reivindicadas podem ser usadas para incrementar a expressão dos genes AOC, do gene codificante para a Cistatina, do gene codificante para a β -1,3-Glucanase e do gene *tll* (de proteína *Taumatina-like* de *C. sativa*) endógenos em qualquer órgão da planta, aumentando assim a tolerância à doença da tinta. A sobreexpressão pode ser conseguida através de *sense upregulation*, introduzindo moléculas de mRNA, RNA, cDNA e DNA em orientação *sense*.

Isolamento de Sequências de Ácidos Nucleicos a partir de Plantas

Os genes descritos na presente invenção podem ser isolados a partir folhas de plantas inoculadas usando diferentes métodos, bem conhecidos. Em particular, uma abordagem pode ser usada, a descrita nesta patente, que consiste no desenho de *primers* específicos a partir de porções conservadas da sequência do mesmo gene, isolada para a mesma espécie, no caso dos genes das Cistatinas e das proteínas *Taumatina-like*, ou desenhados a partir de uma só espécie, a mais próxima filogeneticamente, no caso do gene AOC. Dentro da mesma abordagem foram desenhados *primers* degenerados a partir das porções conservadas dos alinhamentos de sequências do mesmo gene das β -1,3-glucanases, mas de diferentes espécies para as quais estas sequências já tinham sido isoladas e publicadas na base de dados.

Os procedimentos usados para o isolamento de RNA ou cDNA codificantes para uma proteína de acordo com a presente invenção, sujeitando-os ao isolamento de fragmentos de cDNA, ligação dos fragmentos a um vector de clonagem e transformação de uma célula



hospedeira, são bem conhecidos na tecnologia de DNA recombinante. De acordo com esta tecnologia, qualquer pessoa com experiência nesta área pode usar ou adaptar os protocolos detalhados para estes procedimentos, publicados em Sambrook *et. al.* (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York, por exemplo, ou em qualquer outro manual de tecnologia recombinante. Fragmentos dos genes isolados descritos na presente invenção também estão contemplados nesta invenção.


Os *primers* específicos desenhados podem ser substituídos por outros *primers* diferentes, com vista à obtenção de fragmentos ligeiramente diferentes das mesmas sequências de ácidos nucleicos reivindicados nesta patente, progredindo assim no conhecimento de cada sequência. Os *primers* degenerados podem ser usados para obter isoenzimas do mesmo gene noutras espécies de *Castanea* ou para isolar genes análogos a partir de diferentes espécies por PCR ou por outras técnicas de amplificação *in vitro*. Para uma revisão geral sobre as técnicas de PCR consultar o PCR protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. e White, T. eds.), Academic Press, San Diego (1990).

Os polinucleótidos podem ser também sintetizados por técnicas bem conhecidas conforme o descrito na literatura técnica. Fragmentos de DNA de cadeia dupla podem ser obtidos quer sintetizando a cadeia complementar e emparelhando ambas as cadeias sob condições apropriadas, quer adicionando a cadeia complementar usando DNA polimerase com uma sequência de primer apropriada.

Uma vez isolados, os genes descritos na presente invenção podem servir de sondas para o isolamento dos genes correspondentes noutras espécies, por hibridação, sob condições moderadamente ou mesmo pouco estridentes. Usados como sondas heterólogas, os genes isolados podem servir para fazer o *screening* de uma biblioteca de cDNA ou de uma biblioteca genómica, de qualquer espécie. Usadas como sondas homólogas, as sequências de ácidos nucleicos isoladas podem servir para fazer o *screening* de uma biblioteca construída a partir de qualquer espécie do género *Castanea*.

Uso dos Ácidos Nucleicos da Invenção para a Sobreexpressão dos Genes

De acordo com a presente invenção, uma molécula de DNA pode ser operacionalmente ligada a um promotor capaz de regular a expressão da dita molécula de DNA para formar um gene quimérico. Este gene quimérico pode ser introduzido num vector de expressão replicável,



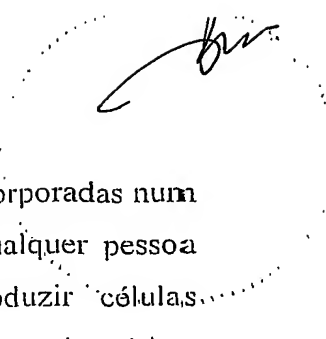
para usar em plantas a transformar. Os vectores de expressão replicáveis podem também ser usados para obter polipéptidos codificados pelos genes da presente invenção, por métodos bem conhecidos de tecnologia de DNA recombinante.

Os vectores de expressão replicáveis possuem geralmente um promotor (pelo menos), um fragmento activador de transcrição (*enhancer*), um sinal de terminação, um sinal de tradução ou uma combinação de dois ou mais destes elementos operativamente ligados numa posição de leitura apropriada. Preferencialmente, os vectores possuem ainda um marcador de selecção, por exemplo, um gene de resistência a um antibiótico. Os vectores de expressão replicáveis podem ser plasmídeos, cosmídeos, bacteriófagos e vírus.

As sequências isoladas podem ser usadas para preparar cassetes de expressão que podem ser úteis numa série de técnicas. Por exemplo, cassetes de expressão utilizando estes genes podem ser usadas para aumentar a expressão dos genes AOC, das Cistatinas, das β -1,3-Glucanases e *lil* endógenos. A sobreexpressão pode ser útil, por exemplo, no aumento da tolerância à doença da tinta em variedades susceptíveis de Castanheiro Europeu, sinalizando as respostas de defesa, no caso do gene AOC, causando dano no fungo patogénico, no caso dos genes das β -1,3-Glucanases e *lil*, ou actuando sobre efeitos nocivos do patogéneo, no caso do gene das Cistatinas.

Para potenciar a expressão dos genes nas plantas, usando a tecnologia *sense*, a sequência codificante ou *open reading frame* de um ácido nucleico de interesse pode ser operacionalmente ligada a um promotor (ao promotor 35S de CaMV, ou a um promotor específico da raiz, por exemplo) de tal forma que a cadeia *sense* de RNA seja transcrita. Esta cassette de expressão pode então ser usada para transformar plantas onde a cadeia de RNA *sense* será produzida. Uma maior acumulação de mRNA que codifica a enzima de interesse, a adicionar à produção endógena, implicará uma maior síntese de enzimas relacionadas com a defesa à doença da tinta, em variedades susceptíveis. Por outro lado, o promotor 35S de CaMV, altamente activo numa vasta variedade de tipos de plantas, poderá fornecer uma expressão constitutiva dos genes de interesse, permitindo uma protecção melhorada contra o *P. cinnamomi*.

Uso dos Ácidos Nucleicos da Invenção para Produzir Plantas Transgénicas



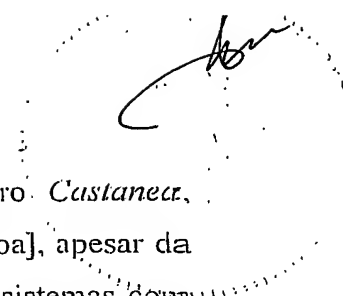
As sequências de ácidos nucleicos isoladas na presente invenção podem ser incorporadas num vector de expressão e serem assim introduzidas numa célula hospedeira. Qualquer pessoa com prática de técnicas de biologia molecular pode desta forma produzir células recombinantes. Possíveis células hospedeiras incluem, mas não estão limitadas a: bactérias, vírus, leveduras, células de mamíferos, insectos, fungos ou plantas. Células vegetais ou bactérias são as células hospedeiras preferenciais.

As sequências de nucleótidos reivindicadas nesta invenção podem ser inseridas num vector de expressão que pode ser introduzido no genoma do hospedeiro vegetal desejado através de uma série de técnicas de transformação convencionais. Construções utilizando os genes isolados podem ser introduzidas num vector convencional de *Agrobacterium tumefaciens*. Durante o processo de infecção da célula hospedeira pelo *Agrobacterium*, a sua função de virulência contida no vector direccionará a inserção da construção e o gene marcador adjacente para o DNA da célula vegetal.

Alternativamente, as construções de DNA podem ser directamente introduzidas no DNA genómico das células vegetais usando técnicas tais como a electroporação e microinjecção em protoplastos de células vegetais. Métodos de balística, tais como o bombardeamento de partículas de DNA, permitem a introdução de DNA directamente nos tecidos vegetais.

As células vegetais transformadas obtidas a partir de quaisquer uma das técnicas acima mencionadas podem ser colocadas em cultura para regenerarem uma planta inteira possuindo o genótipo transformado e, conseqüentemente, o fenótipo desejado, como por exemplo, árvores com maior tolerância à doença da tinta. Tais técnicas de regeneração baseiam-se na manipulação de determinados nutrientes e reguladores de crescimento num meio de cultura contendo um antibiótico, herbicida, ou outro marcador de selecção que tenha sido introduzido conjuntamente com as sequências de nucleótidos de interesse. A regeneração pode ser feita a partir de diferentes explantes ou de embriões. Para uma visão geral, ver Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods (O.L. Gamborg e G.C. Philips eds.), Springer-Verlag, 1995. Os tecidos vegetais que podem ser utilizados para transformação incluem, mas não estão limitados a, gemas florais, tecido foliar, tecido radicular, meristemas, embriões zigóticos e somáticos, anteras, micrósporos e macrósporos.

A introdução de genes no DNA genómico de *C. sativa*, por transformação via *Agrobacterium* de entrenós de plântulas *in vitro* já foi conseguida [Seabra, R.M.L.C. (1998), Transformação



Genética de *Castanea sativa* Mill. e Caracterização Molecular do Género *Castanea*, Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa], apesar da recalcitrância em relação à transformação e à regeneração de plantas. Outros sistemas com enorme potencial ainda não foram testados como alternativa, como o bombardeamento de embriões somáticos de *C. sativa* [Seabra, R.C., Pais, M.S. (2003) Genetic Transformation of Chestnut, em Plant Genetic Engineering, Vol. 3, Singh, R.P., Jaiwal, P.K. eds., SCI Tech Publishing LLC, USA]. O bombardeamento de embriões somáticos de *Quercus suber*, da família *Fagaceae* tal como *C. sativa*, já foi conseguido por Neto, H. (1995), Estudo das Condições de Cultura *in vitro* e de Transferência de Genes em *Quercus suber* L., Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. A utilização de embriões somáticos em transformação genética é uma vantagem, já que constituem órgãos geneticamente uniformes e reproduzem as características da planta-mãe. A regeneração via embriogénese somática permite assim ultrapassar muitas das desvantagens da regeneração via organogénese, com origem multicelular [Dunstan, D.I., Thorpe, T.A. (1986). Regeneration in Forest Trees. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant, Vol. 3].

As plantas transformadas com os genes desta invenção podem manifestar um padrão de sobreexpressão dos genes AOC e/ou de Cistatinas e/ou de β -1,3-Glucanases e/ou *III*. As plantas assim transformadas podem evidenciar maior resistência a ataques de patógenos, nomeadamente ao ataque de fungos, atrasando, diminuindo ou mesmo prevenindo a extensão das feridas/danos provocados pelo patógeno.

As moléculas de DNA da presente invenção podem ser usadas para transformar qualquer planta em que a expressão da proteína codificada pela dita molécula de DNA seja desejada. As moléculas de DNA da presente invenção podem ser utilizadas numa série de plantas, mas são particularmente úteis na produção de plantas geneticamente transformadas dos géneros *Castanea* e *Quercus*.

Qualquer pessoa experiente na matéria reconheceria que ensaios de actividade enzimática, de imunoquímica, *western blotting* e outros ensaios de detecção podem ser usados para detectar os níveis de proteínas e a presença ou ausência de proteínas codificadas pelas sequências isoladas. Ao nível do DNA, técnicas como *southern blotting*, *northern blotting* e amplificação de DNA por PCR podem ser executadas para determinar se houve ou não integração das

sequências génicas desejadas no DNA da planta e se ocorreu sobreexpressão dos genes endógenos devido à acção das sequências introduzidas.

Qualquer pessoa com experiência poderia reconhecer que após a incorporação estável e operacional de uma cassette numa planta transgénica, essa cassette poderá ser introduzida noutras plantas através de cruzamentos sexuais. Várias são as técnicas de cruzamentos sexuais que podem ser utilizadas, dependendo das espécies a cruzar. As sementes transgénicas e propágulos da planta transformada podem também ser obtidos e, quando colocados em cultura sob condições adequadas, podem originar novas plantas transgénicas.

As possíveis utilizações a dar a esta invenção, acima referidas, são descritas com o intuito de melhor ilustrar a aplicação prática da invenção e não devem ser usadas como limitantes da própria invenção. Deve ser entendido que a invenção não se restringe ao material usado em particular, às combinações de materiais e aos procedimentos seleccionados para atingir os fins desejados. Numerosas variações de tais detalhes podem ser introduzidas e devem ser apreciadas por alguém com experiência na área.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

Foi utilizada para a listagem de sequências o formato **WIPO STANDARD ST.25**

<110> CASTANIA CASTANIA, Sociedade Agroflorestal, S.A.

<120> Genes codificantes de Óxido de Aleno Ciclase (AOC), Cistatina, β -1,3-Glucanase e de Proteína Taumatin-like isolados de Castanheiro Europeu (*Castanea sativa* Mill.)

<130> 1

<160> 17

<210> 1

<211> 735

<212> DNA

<213> *Castanea sativa*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(735)

<223>

<400> 1

atg gcc act gtt tcc tca gcc tct gct gct ctt aga acc att tct tct 48
Met Ala Thr Val Ser Ser Ala Ser Ala Ala Leu Arg Thr Ile Ser Ser
1 5 10 15

tcc tca tcc aag cta tct tct gcc ttc caa act aaa aag atc caa tct 96
Ser Ser Ser Lys Leu Ser Ser Ala Phe Gln Thr Lys Lys Ile Gln Ser
20 25 30

ttt aaa cta cct aac cct ctc att tct cag aat cat aaa ctt act acc 144
Phe Lys Leu Pro Asn Pro Leu Ile Ser Gln Asn His Lys Leu Thr Thr
35 40 45

acc tct act act gct tcc aga tca ttt tcc tgc aag agc cag agc acc 192
Thr Ser Thr Thr Ala Ser Arg Ser Phe Ser Cys Lys Ser Gln Ser Thr
50 55 60

tca aca gat tca act aac act gaa gtt caa gaa ctt agt gtc tat gag 240
Ser Thr Asp Ser Thr Asn Thr Glu Val Gln Glu Leu Ser Val Tyr Glu
65 70 75 80

atc aat gaa cgt gat cgt gga agc cct gct tat ctt cga ttg agc caa 288
Ile Asn Glu Arg Asp Arg Gly Ser Pro Ala Tyr Leu Arg Leu Ser Gln
85 90 95

aag act gtt aat tca ctc gga gat ctt gtc ccc ttt agc aac aag cta 336
Lys Thr Val Asn Ser Leu Gly Asp Leu Val Pro Phe Ser Asn Lys Leu
100 105 110

tat act gca gat cta aag aag aga att gga ata aca gca gga ctc tgc 384
Tyr Thr Ala Asp Leu Lys Lys Arg Ile Gly Ile Thr Ala Gly Leu Cys
115 120 125

att ctg atc aag cnc gaa gaa gag aag aaa gga gat cgc tat gaa gct 432
Ile Leu Ile Lys His Glu Glu Glu Lys Lys Gly Asp Arg Tyr Glu Ala
130 135 140

glt tac agc ttc tac ttc ggc gat tac ggt cat atc gcc gtt cag gga 480
Val Tyr Ser Phe Tyr Phe Gly Asp Tyr Gly His Ile Ala Val Gln Gly
145 150 155 160

ggg tac tta acc tat gaa gaa act tac cta gcc gtc acc ggt gga tcc 528
Ala Tyr Leu Thr Tyr Glu Glu Thr Tyr Leu Ala Val Thr Gly Gly Ser
165 170 175

ggc ata ttt gca ggg gtt tcc ggt caa gtg aaa ttg cag caa ctc att 576
Gly Ile Phe Ala Gly Val Ser Gly Gln Val Lys Leu Gln Gln Leu Ile
180 185 190



ttc cct ttc aag cta ttt tac act ttt tac ttg aag ggg atc ccc ggt 624
Phe Pro Phe Lys Leu Phe Tyr Thr Phe Tyr Leu Lys Gly Ile Pro Gly
195 200 205

ctg cca tct gaa ttg ttg tgt acg gcg gtt cct ccg tcg ccg acg gtg 672
Leu Pro Ser Glu Leu Leu Cys Thr Ala Val Pro Pro Ser Pro Thr Val
210 215 220

gag cca aca cct gaa gct aaa gct tgt gag gaa ggg gcc gca ctg aaa 720
Glu Pro Thr Pro Glu Ala Lys Ala Cys Glu Glu Gly Ala Ala Leu Lys
225 230 235 240

aat tac act aat taa 735
Asn Tyr Thr Asn

<210> 2
<211> 244
<212> PRT
<213> Castanea sativa

<400> 2

Met Ala Thr Val Ser Ser Ala Ser Ala Ala Leu Arg Thr Ile Ser Ser
1 5 10 15

Ser Ser Ser Lys Leu Ser Ser Ala Phe Gln Thr Lys Lys Ile Gln Ser
20 25 30

Phe Lys Leu Pro Asn Pro Leu Ile Ser Gln Asn His Lys Leu Thr Thr
35 40 45

Thr Ser Thr Thr Ala Ser Arg Ser Phe Ser Cys Lys Ser Gln Ser Thr
50 55 60

Ser Thr Asp Ser Thr Asn Thr Glu Val Gln Glu Leu Ser Val Tyr Glu
65 70 75 80

Ile Asn Glu Arg Asp Arg Gly Ser Pro Ala Tyr Leu Arg Leu Ser Gln
85 90 95

Lys Thr Val Asn Ser Leu Gly Asp Leu Val Pro Phe Ser Asn Lys Leu
100 105 110



Tyr Thr Ala Asp Leu Lys Lys Arg Ile Gly Ile Thr Ala Gly Leu Cys
115 120 125

Ile Leu Ile Lys His Glu Glu Glu Lys Lys Gly Asp Arg Tyr Glu Ala
130 135 140

Val Tyr Ser Phe Tyr Phe Gly Asp Tyr Gly His Ile Ala Val Gln Gly
145 150 155 160

Ala Tyr Leu Thr Tyr Glu Glu Thr Tyr Leu Ala Val Thr Gly Gly Ser
165 170 175

Gly Ile Phe Ala Gly Val Ser Gly Gln Val Lys Leu Gln Gln Leu Ile
180 185 190

Phe Pro Phe Lys Leu Phe Tyr Thr Phe Tyr Leu Lys Gly Ile Pro Gly
195 200 205

Leu Pro Ser Glu Leu Leu Cys Thr Ala Val Pro Pro Ser Pro Thr Val
210 215 220

Glu Pro Thr Pro Glu Ala Lys Ala Cys Glu Glu Gly Ala Ala Leu Lys
225 230 235 240

Asn Tyr Thr Asn

<210> 3

<211> 318

<212> DNA

<213> Castanea sativa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

<223>

<400> 3

atg aga aaa ttg gca gca cta gtt gga gga gtg tca gat gtt aag gga 48
Met Arg Lys Leu Ala Ala Leu Val Gly Gly Val Ser Asp Val Lys Gly
1 5 10 15

cat gag aac agc ttg cag atc gac gac ctc gct cgt ttt gct gtc gac 96
His Glu Asn Ser Leu Gln Ile Asp Asp Leu Ala Arg Phe Ala Val Asp
20 25 30

gac cac aac aag aaa gcg aat aca ctg ctg cag ttt aag aag gtg gtg 144
Asp His Asn Lys Lys Ala Asn Thr Leu Leu Gln Phe Lys Lys Val Val
35 40 45

aat gcg aaa cag cag gtg gtt tct gga aca ata tac att cta acg ttg 192
Asn Ala Lys Gln Gln Val Val Ser Gly Thr Ile Tyr Ile Leu Thr Leu
50 55 60

gag gtg gag gat ggc ggg aag aag aaa gtt tat gaa gcc aag att tgg 240
Glu Val Glu Asp Gly Gly Lys Lys Lys Val Tyr Glu Ala Lys Ile Trp
65 70 75 80

gag aag cca tgg ttg aac ttc aag gag gtg cag gaa ttt aag ctc att 288
Glu Lys Pro Trp Leu Asn Phe Lys Glu Val Gln Glu Phe Lys Leu Ile
85 90 95

ggt gat gcc cct aca cac cat agt gct taa 318
Gly Asp Ala Pro Thr His His Ser Ala
100 105

<210> 4

<211> 105

<212> PRT

<213> Castanea sativa

<400> 4

Met Arg Lys Leu Ala Ala Leu Val Gly Gly Val Ser Asp Val Lys Gly
1 5 10 15

His Glu Asn Ser Leu Gln Ile Asp Asp Leu Ala Arg Phe Ala Val Asp
20 25 30

Asp His Asn Lys Lys Ala Asn Thr Leu Leu Gln Phe Lys Lys Val Val
35 40 45



Asn Ala Lys Gln Gln Val Val Ser Gly Thr Ile Tyr Ile Leu Thr Leu
50 55 60

Glu Val Glu Asp Gly Gly Lys Lys Lys Val Tyr Glu Ala Lys Ile Trp
65 70 75 80

Glu Lys Pro Trp Leu Asn Phe Lys Glu Val Gln Glu Phe Lys Leu Ile
85 90 95

Gly Asp Ala Pro Thr His His Ser Ala
100 105

<210> 5
<211> 927
<212> DNA
<213> Castanea sativa

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(927)
<223>

<400> 5
atg aga atc tat gat ccg aat cag gct gtt cta caa gcc ctt aga ggc 48
Met Arg Ile Tyr Asp Pro Asn Gln Ala Val Leu Gln Ala Leu Arg Gly
1 5 10 15

tct aac att gaa gtc atg cta ggt gtc cca aac tca gac ctt caa agc 96
Ser Asn Ile Glu Val Met Leu Gly Val Pro Asn Ser Asp Leu Gln Ser
20 25 30

ctt gcc aac cct tcc aat gca caa gca tgg gta caa aga aac gta ctt 144
Leu Ala Asn Pro Ser Asn Ala Gln Ala Trp Val Gln Arg Asn Val Leu
35 40 45

aac ttc tgg cct agt gtc agg ttt cga tac att gca gtt gga aat gaa 192
Asn Phe Trp Pro Ser Val Arg Phe Arg Tyr Ile Ala Val Gly Asn Glu
50 55 60

gtg agt cct gtt aat gga ggc aca gct ggg tta gca caa att gtt ctc 240
Val Ser Pro Val Asn Gly Gly Thr Ala Gly Leu Ala Gln Ile Val Leu
65 70 75 80

How

cct gcc tta acc aac gta ttc aat gca att aga tca gct ggc ctt aag 288
Pro Ala Leu Thr Asn Val Phe Asn Ala Ile Arg Ser Ala Gly Leu Lys
85 90 95

gac caa atc cag gtt tca att gca att gac atg acc tta ata gga aac 336
Asp Gln Ile Gln Val Ser Ile Ala Ile Asp Met Thr Leu Ile Gly Asn
100 105 110

tcc tat cct ccg tca gca ggg gct ttc aga ggt gat gtt aga tca tat 384
Ser Tyr Pro Pro Ser Ala Gly Ala Phe Arg Gly Asp Val Arg Ser Tyr
115 120 125

tta gac cca atc att ggt cac cta gta tat gct aag gca ccc tta cta 432
Leu Asp Pro Ile Ile Gly His Leu Val Tyr Ala Lys Ala Pro Leu Leu
130 135 140

gcc aat gtg tac act tat ttt agc tat gct gga aat cca cgc gac att 480
Ala Asn Val Tyr Thr Tyr Phe Ser Tyr Ala Gly Asn Pro Arg Asp Ile
145 150 155 160

tct ctt ccc tat gct ttg ttt act tcc cca tca gtt gtg gca tgg gat 528
Ser Leu Pro Tyr Ala Leu Phe Thr Ser Pro Ser Val Val Ala Trp Asp
165 170 175

ggc cct aag gga tac caa aac ctt ttt gat gca atg atg gat gca ttg 576
Gly Pro Lys Gly Tyr Gln Asn Leu Phe Asp Ala Met Met Asp Ala Leu
180 185 190

tac tca gct ctc gag agg tgg tgg ggc ggt tca ttg gag gtt gtt gtt 624
Tyr Ser Ala Leu Glu Arg Ser Trp Gly Gly Ser Leu Glu Val Val Val
195 200 205

tca gag agt gga tgg cca tca gca gca ggt gga ttc gct aca tca ttt 672
Ser Glu Ser Gly Trp Pro Ser Ala Ala Gly Gly Phe Ala Thr Ser Phe
210 215 220

gat aat gca cgt act tat tac tca aat ttg att aag cat gtc aaa ggg 720
Asp Asn Ala Arg Thr Tyr Tyr Ser Asn Leu Ile Lys His Val Lys Gly
225 230 235 240

ggc aca cca aag agg cct ggg gga gct ata gag acc tat ctt ttt gcc 768
Gly Thr Pro Lys Arg Pro Gly Gly Ala Ile Glu Thr Tyr Leu Phe Ala
245 250 255

atg ttt aat gag aat cag aaa caa cca gag cta gag aaa aac ttt gcc 816
Met Phe Asn Glu Asn Gln Lys Gln Pro Glu Leu Glu Lys Asn Phe Gly
260 265 270

tta ttc ttc cca aat aaa cag ccc aaa ttt aac ctc aat ttt ggt gga 864
 Leu Phe Phe Pro Asn Lys Gln Pro Lys Phe Asn Leu Asn Phe Gly Gly
 275 280 285

gaa aga atc tgg gat gtc act gct gaa tat aat gca aca gtt tcc ctc 912
 Glu Arg Ile Trp Asp Val Thr Ala Glu Tyr Asn Ala Thr Val Ser Leu
 290 295 300

agt agt gat atg taa 927
 Ser Ser Asp Met
 305

<210> 6
 <211> 308
 <212> PRT
 <213> Castanea sativa

<400> 6

Met Arg Ile Tyr Asp Pro Asn Gln Ala Val Leu Gln Ala Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Ser Asn Ile Glu Val Met Leu Gly Val Pro Asn Ser Asp Leu Gln Ser
 20 25 30

Leu Ala Asn Pro Ser Asn Ala Gln Ala Trp Val Gln Arg Asn Val Leu
 35 40 45

Asn Phe Trp Pro Ser Val Arg Phe Arg Tyr Ile Ala Val Gly Asn Glu
 50 55 60

Val Ser Pro Val Asn Gly Gly Thr Ala Gly Leu Ala Gln Ile Val Leu
 65 70 75 80

Pro Ala Leu Thr Asn Val Phe Asn Ala Ile Arg Ser Ala Gly Leu Lys
 85 90 95

Asp Gln Ile Gln Val Ser Ile Ala Ile Asp Met Thr Leu Ile Gly Asn
 100 105 110

fu

Ser Tyr Pro Pro Ser Ala Gly Ala Phe Arg Gly Asp Val Arg Ser Tyr
115 120 125

Leu Asp Pro Ile Ile Gly His Leu Val Tyr Ala Lys Ala Pro Leu Leu
130 135 140

Ala Asn Val Tyr Thr Tyr Phe Ser Tyr Ala Gly Asn Pro Arg Asp Ile
145 150 155 160

Ser Leu Pro Tyr Ala Leu Phe Thr Ser Pro Ser Val Val Ala Trp Asp
165 170 175

Gly Pro Lys Gly Tyr Gln Asn Leu Phe Asp Ala Met Met Asp Ala Leu
180 185 190

Tyr Ser Ala Leu Glu Arg Ser Trp Gly Gly Ser Leu Glu Val Val Val
195 200 205

Ser Glu Ser Gly Trp Pro Ser Ala Ala Gly Gly Phe Ala Thr Ser Phe
210 215 220

Asp Asn Ala Arg Thr Tyr Tyr Ser Asn Leu Ile Lys His Val Lys Gly
225 230 235 240

Gly Thr Pro Lys Arg Pro Gly Gly Ala Ile Glu Thr Tyr Leu Phe Ala
245 250 255

Met Phe Asn Glu Asn Gln Lys Gln Pro Glu Leu Glu Lys Asn Phe Gly
260 265 270

Leu Phe Phe Pro Asn Lys Gln Pro Lys Phe Asn Leu Asn Phe Gly Gly
275 280 285

Glu Arg Ile Trp Asp Val Thr Ala Glu Tyr Asn Ala Thr Val Ser Leu
290 295 300

Handwritten signature

Ser Ser Asp Met
305

<210> 7
<211> 732
<212> DNA
<213> Castanea sativa

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(732)
<223>

<400> 7
atg aaa acc ctg gca ctc tac ggc ctt acc ttg gcc ttc ttt ttc tta 48
Met Lys Thr Leu Ala Leu Tyr Gly Leu Thr Leu Ala Phe Phe Phe Leu
1 5 10 15

tct ggt gca cac tct gct aaa ata act ttc aca aac aac tgt cca aga 96
Ser Gly Ala His Ser Ala Lys Ile Thr Phe Thr Asn Asn Cys Pro Arg
20 25 30

acc atc tgg cca gga acc cta act tcg gat caa aaa cct caa ctt tca 144
Thr Ile Trp Pro Gly Thr Leu Thr Ser Asp Gln Lys Pro Gln Leu Ser
35 40 45

aaa act gga ttt gag tta gca tcc aaa gca tcc tta aca ttg gaa tgt 192
Lys Thr Gly Phe Glu Leu Ala Ser Lys Ala Ser Leu Thr Leu Glu Cys
50 55 60

tca agc tcc atg gaa agg ccg gtt ttg ggc ccg aac ccg atg cac cac 240
Ser Ser Ser Met Glu Arg Pro Val Leu Gly Pro Asn Pro Met His His
65 70 75 80

caa atc agg aaa gtt cac ttg cga gac tgc tga ttg tag cac cgg tca 288
Gln Ile Arg Lys Val His Leu Arg Asp Cys Leu His Arg Ser
85 90

ggg tgc atg caa tgg taa cgg tgc aat ccc acc agc ttc ttt agt aga 336
Gly Cys Met Gln Trp Arg Cys Asn Pro Thr Ser Phe Phe Ser Arg
95 100 105

aat caa cat agc agc caa tcg tgg gat gga cta tta tga tgt tag cct 384
Asn Gln His Ser Ser Gln Ser Trp Asp Gly Leu Leu Cys Pro
110 115 120

tgt aga tgg ctt caa ctt gcc tgt ttc tgt agc cac cag agg cgg cac 432
Cys Arg Trp Leu Gln Leu Ala Cys Phe Cys Ser His Gln Arg Arg His
125 130 135

tgg tga ttg caa ggc cac aag ctg tcc agc taa tgt gaa cgc agt ttg 480
Trp Leu Gln Gly His Lys Leu Ser Ser Cys Glu Arg Ser Leu
140 145 150

ccc agc gga att aca agt gaa agg gtc tga tgg gag cgt gct tgc ttg 528
Pro Ser Gly Ile Thr Ser Glu Arg Val Trp Glu Arg Ala Cys Leu
155 160 165

caa gag cgc ttg tat tgc ttt caa tca acc aca gta ctg ttg cac tgg 576
Gln Glu Arg Leu Tyr Cys Phe Gln Ser Thr Thr Val Leu Leu His Trp
170 175 180

tgc att taa cac ccc gaa aac atg tcc acc cac aaa ata ttc tgc cat 624
Cys Ile His Pro Glu Asn Met Ser Thr His Lys Ile Phe Ser His
185 190 195

ctt taa gca aca atg tcc tca agc tta tag cta tgc tta tga tga tcc 672
Leu Ala Thr Met Ser Ser Ser Leu Leu Cys Leu Ser
200 205 210

tac cag cac ctt tac ctg ctc aag tgc acc cga cta tgt tat cgc att 720
Tyr Gln His Leu Tyr Leu Leu Lys Cys Thr Arg Leu Cys Tyr Arg Ile
215 220 225

ttg tcc ata aat 732
Leu Ser Ile Asn
230

<210> 8
<211> 226
<212> PRT
<213> Castanea sativa

<400> 8

Met Lys Thr Leu Ala Leu Tyr Gly Leu Thr Leu Ala Phe Phe Phe Leu
1 5 10 15

Ser Gly Ala His Ser Ala Lys Ile Thr Phe Thr Asn Asn Cys Pro Arg
20 25 30



Thr Ile Trp Pro Gly Thr Leu Thr Ser Asp Gln Lys Pro Gln Leu Ser
35 40 45

Lys Thr Gly Phe Glu Leu Ala Ser Lys Ala Ser Leu Thr Leu Glu Cys
50 55 60

Ser Ser Ser Met Glu Arg Pro Val Leu Gly Pro Asn Pro Met His His
65 70 75 80

Gln Ile Arg Lys Val His Leu Arg Asp Cys His Arg Ser Gly Cys Met Gln
85 90

Trp Arg Cys Asn Pro Thr Ser Phe Phe Ser Arg Asn Gln His Ser Ser Gln
100 105 110

Ser Trp Asp Gly Leu Leu Pro Cys Arg Trp Leu Gln Leu Ala Cys Phe Cys
115 120 125 130

Ser His Gln Arg Arg His Trp Leu Gln Gly His Lys Leu Ser Ser Cys Glu
135 140 145

Arg Ser Leu Pro Ser Gly Ile Thr Ser Glu Arg Val Trp Glu Arg Ala Cys
150 155 160 165

Leu Gln Glu Arg Leu Tyr Cys Phe Gln Ser Thr Thr Val Leu Leu His Trp
170 175 180

Cys Ile His Pro Glu Asn Met Ser Thr His Lys Ile Phe Ser His Leu Ala
185 190 195

Thr Met Ser Ser Ser Leu Ser Tyr Gln His Leu Tyr Leu Leu Lys Cys Thr
200 205 210 215

Arg Leu Cys Tyr Arg Ile Leu Ser Ile Asn
220 225

Pelo Requerente

O Mandatário 

VITOR LUÍS RIBEIRO CARDOSO

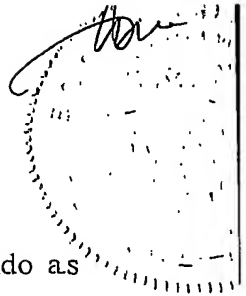
Agente Oficial da Propriedade Industrial (89C)

Largo de São Domingos N.º 1

2910-092 SETÚBAL

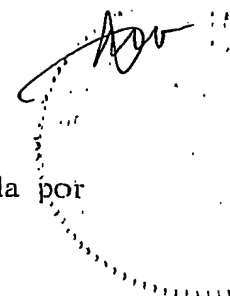
PORTUGAL

Telef. ++351 265 228 635 - Fax: ++ 351 265 228 637



REINVIDICAÇÕES

1. Quatro sequências de ácidos nucleicos isoladas de Castanheiro Europeu compreendendo as regiões codificantes para as proteínas Óxido de Aleno Ciclase (*AOCCy*) Cistatina (*CystCy*) β -1,3-Glucanase (*β GlucCs*) e *Thaumatococcus-like* (*tl1*).
2. A sequência de ácidos nucleicos isolada descrita na reivindicação 1 caracterizada por possuir a sequência da SEQ. ID. NO:1.
3. A sequência de ácidos nucleicos isolada descrita na reivindicação 2 caracterizada por codificar um polipéptido de Óxido de Aleno Ciclase (AOC).
4. A sequência de ácidos nucleicos isolada descrita na reivindicação 2 caracterizada por codificar uma proteína ou um polipéptido com a sequência de aminoácidos da SEQ. ID. NO:2.
5. A sequência de ácidos nucleicos isolada descrita na reivindicação 1 caracterizada por possuir a sequência da SEQ. ID. NO:3.
6. A sequência de ácidos nucleicos isolada descrita na reivindicação 5 caracterizada por codificar um polipéptido de Cistatina.
7. A sequência de ácidos nucleicos isolada descrita na reivindicação 5 caracterizada por codificar uma proteína ou um polipéptido com a sequência de aminoácidos da SEQ. ID. NO:4.
8. A sequência de ácidos nucleicos isolada descrita na reivindicação 1 caracterizada por possuir a sequência da SEQ. ID. NO:5.
9. A sequência de ácidos nucleicos isolada descrita na reivindicação 8 caracterizada por codificar um polipéptido de β -1,3-Glucanase.
10. A sequência de ácidos nucleicos isolada descrita na reivindicação 8 caracterizada por codificar uma proteína ou polipéptido com a sequência de aminoácidos da SEQ. ID. NO:6.
11. A sequência de ácidos nucleicos isolada descrita na reivindicação 1 caracterizada por possuir a sequência da SEQ. ID. NO:7.

- 
12. A sequência de ácidos nucleicos isolada descrita na reivindicação 11 caracterizada por codificar um polipéptido de Thaumatin-like.
 13. A sequência de ácidos nucleicos isolada descrita na reivindicação 11 caracterizada por codificar uma proteína ou um polipéptido com a sequência de aminoácidos da SEQ. ID. NO:8.
 14. As sequências de ácidos nucleicos isoladas descritas na reivindicação 1 caracterizadas por poderem ser apresentadas na forma de moléculas de RNA mRNA cRNA cDNA e DNA.
 15. As sequências de ácidos nucleicos isoladas descritas na reivindicação 1 caracterizadas por poderem ser usadas conjuntamente com outros genes expressos no Castanheiro Europeu.
 16. Um gene quimérico compreendendo uma ou mais moléculas de ácidos nucleicos descritas na reivindicação 1 orientadas em sense e que podem ser operacionalmente ligadas a um promotor.
 17. Uma cassete de expressão compreendendo pelo menos um dos genes quiméricos descritos na reivindicação 16.
 18. Um vector de expressão compreendendo pelo menos um dos genes quiméricos descritos na reivindicação 16.
 19. O genoma de uma planta desde que possua pelo menos um dos genes quiméricos descritos na reivindicação 16.
 20. Uma célula hospedeira transformada com pelo menos um dos genes quiméricos descritos na reivindicação 16.
 21. Uma planta geneticamente modificada contendo pelo menos um dos genes descritos na reivindicação 16 caracterizados por estarem estavelmente integrados no genoma da dita planta.
 22. A descendência de qualquer cruzamento envolvendo a planta descrita na reivindicação 21.
 23. Frutos ou sementes compreendendo pelo menos um dos genes quiméricos descritos na reivindicação 16 caracterizados por estarem estavelmente integrados no genoma.

24. Um método de melhorar a sinalização da resposta de defesa à doença da tinta caracterizado por compreender a introdução de uma cassette de expressão de acordo com o descrito na reivindicação 17.


25. Um método de melhorar a anulação da acção de proteases do fungo patogénico caracterizado por compreender a introdução de uma cassette de expressão de acordo com o descrito na reivindicação 17.

26. Um método de melhorar o ataque à parede celular do fungo patogénico caracterizado por compreender a introdução de uma cassette de expressão de acordo com o descrito na reivindicação 17.

27. Um método de melhorar a permeabilização e ruptura da membrana celular do fungo patogénico caracterizado por compreender a introdução de uma cassette de expressão de acordo com o descrito na reivindicação 17.

Pelo Requerente

O Mandatário


VITOR LUÍS RIBEIRO CARDOSO
Agente Oficial da Propriedade Industrial (39C)
Largo de São Domingos N.º 1
2910-092 SETÚBAL
PORTUGAL
Telel. ++351 265 228 685 - Fax: ++ 351 265 228 037